

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1931

THÈSE

N° 31

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

ALFRED DUBOSQ

NÉ A VILLEBAUDON (MANCHE) LE 23 JUILLET 1880

De la nécessité du dosage biologique
des substances médicamenteuses
renfermant des Vitamines

Président : M. NOBÉCOURT, Professeur

Travail du Service
de

Monsieur le Docteur E. LESNÉ
HOPITAL TROUSSEAU

BOURGEOIS. Éditeur

12, Rue de Lancry, 12 — PARIS

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1931

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

ALFRED DUBOSQ

NÉ A VILLEBAUDON (MANCHE) LE 23 JUILLET 1880

De la nécessité du dosage biologique des substances médicamenteuses renfermant des Vitamines

Président : M. NOBÉCOURT, Professeur

Travail du Service
de

Monsieur le Docteur E. LESNÉ

HOPITAL TROUSSEAU

BOURGEOIS, Éditeur

12, Rue de Lancry, 12 — PARIS



I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale	N.
Physiologie	N.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	LEMIERRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	CLERC.
Pathologie chirurgicale	LENORMANT.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	LOEPER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	MÉNÉTRIER.
Pathologie expérimentale et comparée	RATHERY.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	Maurice VILLARET
Clinique médicale	CARNOT.
	BEZANÇON.
	ACHARD.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	H. CLAUDE.
Cliniques des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	TEISSIER.
Clinique chirurgicale	DEL BET.
	CUNÉO.
	LEJARS.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN
Clinique urologique	LEGUEU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE.
	BRINDEAU.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique	SEBILEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.
Clinique de la tuberculose	Léon BERNARD.
Professeur sans chaire	MAUCLAIRE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

ALAJOUANINE .	Neurologie et Psychiatrie.
BINET . . .	Physiologie.
AUBERTIN . .	Pathologie médicale
BÉNARD (Henri)	Pathologie médicale.
SANNIE . . .	Chimie biologique.
BROcq . . .	Pathologie chirurgicale
BRULÉ . . .	Pathologie médicale.
CADENAT . . .	Pathologie chirurgicale
CATHALA . . .	Pathologie médicale.
CHABROL . . .	Pathologie médicale.
CHEVALLIER . .	Pathologie médicale.
DE GAUDART D'ALLAINES.	Pathologie chirurgicale.
DOGNON . . .	Physique.
DONZELOT . . .	Pathologie médicale.
ÉCALLE . . .	Obstétrique.
FEY	Urologie.
GARNIER . . .	Pathologie expérimentale.
GASTINEL . . .	Bactériologie.
GATELLIER . . .	Pathologie chirurgicale
GIROUD . . .	Histologie.
HARVIER . . .	Pathologie médicale.
HOVELACQUE . .	Anatomie.
HUTINEL . . .	Pathologie médicale.
JOANNON . . .	Hygiène.
LABBÉ (Henri).	Chimie biologique.

MM.

LAROCHE (Guy)	Pathologie médicale.
LEMAITRE . . .	Oto-rhino-laryngologie.
HUGUENIN . . .	Anatomie pathologique.
LEVEUF	Pathologie chirurgicale
LÉVY-VALENSI.	Neuro-psychiatrie.
LIAN	Pathologie médicale.
HAZARD . . .	Pharmacologie.
MILLOT . . .	Histologie.
MONDOR . . .	Pathologie chirurgicale
MOREAU . . .	Pathologie médicale.
MOULONGUET .	Pathologie chirurgicale
MOURE	Pathologie chirurgicale
MULON	Histologie.
OBERLING . . .	Anatomie pathologique
OLIVIER . . .	Anatomie
PIÉDELIÈVRE .	Médecine légale.
PORTES . . .	Obstétrique.
QUÉNU	Pathologie chirurgicale
RICHET	Physiologie.
SÉZARY	Dermatologie et syphiligraphie.
VALLERY-RADOT	
(Pasteur)	Pathologie médicale.
VAUDESCAL . .	Obstétrique.
VELTER	Ophtalmologie.
VERNE	Histologie.
VIGNES	Obstétrique.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

BUSQUET . . .	Pharmacologie.
GUÉNIOT . . .	Obstétrique.
LEQUEUX . . .	Obstétrique.
LEROUX . . .	Anatomie pathologique

MM.

NEVEU-LEMAIRE .	Parasitologie.
RETTERER . . .	Histologie.
ZIMMERN . . .	Physique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DU COURS DE CLINIQUE

ANNEXE, A TITRE PERMANENT

MM.		MM.	
ABRAMI	Clinique médicale.	BASSET	Clinique chirurgicale
CHIRAY		CHEVASSU	
DEBRE		HEITZ-BOYER	
DUVOIR		MATHIEU	
PIESSINGER		MOCQUOT	
LAIGNEL-LAVASTINE		PROUST	
		SCHWARTZ	
		LE LORIER	
MM.			
LEVY-SOLAL	Clinique Obstétricale		
METZGER			

V. — CHARGÉS DE COURS

MM. MAUCLAIRE, professeur sans chaire.	Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes adultes.
FREY.	
CHAILLEY-BERT	
LEDOUX-LBARD	
WEIL-HALLÉ	
	Stomatologie.
	Éducation physique.
	Radiologie clinique.
	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A Monsieur le Professeur NOBÉCOURT,

qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider notre thèse.

Nous lui adressons ici nos respectueux remerciements.

A Monsieur le Docteur E. LESNÉ.

Médecin de l'Hôpital Trousseau.

Membre de l'Académie de Médecine.

A Monsieur le Docteur Robert CLÉMENT,

Ancien interne des Hôpitaux, ancien chef de clinique,

qui nous ont fourni l'idée de ce travail et ont bien voulu nous guider de leurs conseils éclairés.

A mes maîtres dans les hôpitaux.

INTRODUCTION

C'est presque une banalité de dire que, pour se bien porter, il ne suffit pas qu'un enfant, qu'un adulte absorbe des protéines, des hydrates de carbone, des graisses et des sels minéraux.

Il lui faut associer les vitamines « ces facteurs accessoires de la croissance et de l'équilibre » suivant l'expression de l'école américaine, reprise par MM. Lesné et Binet dans leur étude sur la « Physiologie normale et pathologique du nourrisson ».

Ces vitamines sont sans valeur alimentaire, du moins semble-t-il. Toutefois, ce fut le mérite d'Hopkins d'avoir, le premier, démontré en 1912, qu'elles étaient indispensables à la croissance de l'animal jeune et à l'équilibre de l'adulte.

Avant lui, il y a une trentaine d'années, on avait cru avoir, en présence des progrès de la chimie, dégagé toutes les inconnues du problème alimentaire. Il nous souvient de la proposition faite par un chimiste de quelque notoriété, puisqu'il s'appelait Berthelot, de confectionner une « pilule alimentaire » produit de synthèse qui devait remplacer économiquement notre nourriture un peu désuète.

On voulut appliquer un peu plus tard ce régime scientifiquement conçu et réalisé à des animaux de laboratoire. Ce fut l'insuccès complet.

Aux environs de 1912, Hopkins, puis Osborne, constatèrent que, nourris avec des substances pures, les animaux cessaient de croître.

La chimie était incapable de remplacer la matière.

Le premier de ces auteurs note dans son discours prononcé à la Columbia University de New-York, paru depuis dans le « Journal of Industrial and Engineer Chemistry ».

« Chez les animaux qui recevaient la caséine pure, sans aucune addition, on enregistrerait une chute de poids continue ».

Quoiqu'il en soit de ces vitamines restées mystérieuses et dont l'identité chimique est encore à établir, il reste que leur nombre croît chaque jour au point que, suivant M. Portier « cette apparition fréquente de nouvelles vitamines est assez inquiétante et décevante ».

Il y a peu de temps encore leur nomenclature portait seulement trois groupes ou catégories :

a) Vitamine A, celle des graisses, dite vitamine liposoluble et dont la privation donne naissance à des troubles oculaires dits xérophtalmie, autrement dit facteur de croissance antixérophtalmique.

b) Vitamine B, celle de la cuticule des graines et céréales, de la levure de bière, vitamine hydrosoluble et dont la carence donne naissance au béri-béri, maladie exotique dont l'étude fut intimement liée à la découverte des vitamines.

c) Vitamine C, celle des légumes frais et des fruits, également hydrosoluble et dont la suppression est à l'origine du scorbut.

Depuis, la liste s'est allongée : vitamine D, antirachitique contenue dans l'huile de foie de morue ; vitamine de reproduction (facteur E) ; vitamine P (antipellagreuse).

Il y a plus : deux physiologistes qui se sont plus spécialement occupés de la vitamine B semblent être amenés à démembrer ce facteur en deux autres.

- 1° L'ancien facteur B qui deviendrait la vitamine antinévritique pure ;
- 2° Le nouveau facteur B qui serait une vitamine d'entretien.

Concurremment aussi, et d'une façon impressionnante, se sont développées la vente et la fabrication d'aliments ou médicaments renfermant des vitamines ou prétendant en contenir et, plus récemment encore, parmi ces médicaments un plus grand nombre a vu le jour quand il fut établi que le facteur antirachitique pouvait prendre naissance par l'action de certaines radiations sur les composés de la cholestérine.

Etant prouvé, par exemple, que sous l'influence des rayons ultra-violets d'une certaine longueur d'onde, entre 3.100 à 2.800 Å, selon les expériences de Recrinck et Van Wijk, les stérols pouvaient acquérir des propriétés antirachitiques.

Mais toutes ces substances sont loin d'avoir la même valeur et la même activité thérapeutiques. Dans un article de La Presse Médicale du 30 octobre 1928, Lesné et Robert Clément ont fort insisté sur cette variabilité fort gênante pour le praticien et la mise en œuvre de son traitement. En collaboration avec S. Simon, ils ont pu se rendre compte que 80 0/0 des huiles de foie de morue sont complètement inefficaces contre le rachitisme expérimental, alors que d'autres le guérissent plus ou moins bien, plus ou moins rapidement. Ils auraient noté que la richesse des huiles de foie de morue en facteur de croissance liposoluble (vitamine A) et en facteur D antirachitique varie du simple au triple.

Egalement de grandes variations ont été observées par JAVILLIER et LEVY-LAJEUNESSE.

Certains expérimentateurs trouvent que l'huile brute est plus active que l'huile raffinée ; d'autres, au contraire, constatent que l'huile médicinale, obtenue par expression, est plus active que l'huile brute.

Un certain nombre de préparations prétendant contenir des vitamines B ou C se sont révélées, à l'étude sur les animaux, dépourvus totalement de vitamines.

Ces constatations, et bien d'autres que l'on peut mentionner à l'appui, plaident, semble-t-il, singulièrement en faveur de l'établissement d'un contrôle.

Nous essaierons de dire sur quelles bases celui-ci peut être établi.

CHAPITRE I

INTÉRÊT PRATIQUE DU CONTRÔLE BIOLOGIQUE DES VITAMINES DU CONTRÔLE BIOLOGIQUE EN GÉNÉRAL

Ce contrôle n'a pas une portée seulement théorique mais présente aussi un intérêt pratique. Prenons un seul exemple emprunté au traitement du rachitisme par les substances irradiées, vectrices du facteur D ou vitasterine D de FUNK.

Ces substances modifient, de façon très active, la teneur du sang en *phosphore et en chaux*, peut-être aussi en globules.

Très vite, sous l'effet du traitement d'une semaine, VOGT et HOTTINGER ont vu le taux du phosphore minéral sanguin, diminué dans le rachitisme, atteindre la normale qui est de 5 mmgr. pour 100.

De même pour le calcium.

Mais, d'autre part, KREITMAR et MOU, puis LEVADITI et d'autres ont observé des troubles, *sclérose vasculaire*, infiltration calcaire des viscères concomitants avec l'hypercalcémie chez le rat soumis à des doses exagérées d'ergostérol.

MALMOSTROM, en 1925, démontrait que l'huile de foie de morue trop irradiée devient toxique. De leur côté BAMBURGER et DEGHOWITZ citent les mauvais effets produits chez certains enfants par l'emploi prolongé des stérols irradiés.

On sait, d'autre part, que l'ergostérine irradiée est parfois dangereuse PFAMENSTIEL, REYER et WALKHOFF l'ont constaté expérimentalement.

On sait encore que les U. V. microbicides sont aussi abiotiques (DESTRE) à petites longueurs d'onde.

Il y a, d'ailleurs, des radio-sensibilités (radiolite du Professeur GUGEROT) comme il y a des radio-anaphylaxies.

L'action de ces substances et agents physiques est réelle, certaine et assez rapprochée dans le temps. Mais, précisément, parce que cette action est telle, la diversité et l'imprécision des doses prescrites nous paraissent encore plus irrationnelles. Alors que WOLMER administre 5 à 10 mmgr. par jour à ses nourrissons, à titre curatif et 1 mmgr. à titre prophylactique, GYORGY emploie 1 à 4 mmgr.

Et ce n'est pas seulement sur les doses que subsiste le désaccord mais encore sur la durée de la prescription. En bref, leur posologie reste à établir.

Faut-il s'étonner de cet état de choses et de l'imprécision actuelle concernant le dosage ou étalonnage des substances à vitamines ?

La situation n'est d'ailleurs pas spéciale à ces vitamines et, pas davantage, n'est nouveau le désir de précision, de plus en plus marqué, qu'elles ont suscité, alors que leur rôle vital devait plus évident chaque jour.

C'est le Professeur TIFFENEAU qui écrit, concernant cette tendance générale à l'unité, en matière médicamenteuse « assurer la constance des « effets thérapeutiques, des drogues végétales ou animales et de leurs « diverses préparations galéniques, et cela en dépit des caprices de la « nature et malgré les différences de composition que peuvent présenter « ces drogues suivant leur origine et les conditions de leur récolte ou de « leur manutention, telle a toujours été l'une des principales occupations « des pharmacologues ».

Un besoin de clarté et de synthèse, d'unification, disons de standardisation s'est fait jour depuis quelques années dans les différentes pharmacopées. En même temps, ou presque, les méthodes de contrôle biologique ont peu à peu pris le pas sur les méthodes d'analyse chimique, issues du XIX^e siècle et dont l'insuffisance était apparue.

Est-ce à dire que ces méthodes biologiques qui mesurant, soit la toxicité globale, soit un effet physiologique chez un animal donné ne présentent pas quelques inconvénients ?

Nul ne le prétend. Leur mise au point est délicate : pour apprécier sainement leurs résultats, il faut tenir compte comme le dit encore le Professeur TIFFENEAU « de la variation de sensibilité du matériel vivant, « des difficultés de la technique et de la complexité des actions pharmacodynamiques ».

CHAPITRE II

TITRE A

DE QUELQUES PRÉCÉDENTS DANS L'APPLICATION

DES MÉTHODES DE DOSAGE BIOLOGIQUE

CE QU'A PRÉCONISÉ LA COMMISSION D'HYGIÈNE

DE LA SOCIÉTÉ DES NATIONS

Il n'en reste pas moins vrai que les méthodes biologiques constituent un progrès sérieux et à ce point d'actualité que la Commission d'Hygiène de la Société des Nations, reconnaissant leur excellence, a recommandé leur emploi. Et, soit à Edimbourg en juillet 1923, soit à Genève en 1925, soit à Francfort-sur-le-Mein en 1928, les commissions internationales réunies sous son inspiration ont préconisé quelques règles et formulé quelques recommandations concernant ces méthodes de dosage.

Ces recommandations peuvent se résumer ainsi :

1^o L'activité physiologique d'une substance médicamenteuse ne peut être exprimée en valeur absolue mais seulement comparativement à un étalon préalablement choisi ;

2^o Cet étalon peut être la substance médicamenteuse elle-même, soit son principal constituant actif, défini, ou tout autre produit officinal de même nature, titré par rapport à cette substance ;

3^o Il est ou ne peut plus souhaitable que les conditions d'expérimentation tant de la substance étalon que de la substance à comparer soient les mêmes ;

4^o Ce qu'il convient de mesurer dans une substance médicamenteuse, c'est le principe actif dont les propriétés seront utilisées en pratique.

A titre indicatif, voici une recommandation adoptée à Edimbourg par la *Conférence technique pour l'étude de certaines méthodes de standardisation biologique*.

Discussion ouverte par le Professeur TIFFENEAU.

Elle concerne l'*ergot de seigle*. Transcrivons :

« La conférence recommande d'établir la préparation d'ergot des « pharmacopées de manière que ces préparations renferment autant d'alcaloïdes spécifiques que possible (ergotoxine, ergotamine) de la matière « originale dont elles dérivent. Elle déclare, en outre, qu'il conviendrait « de poursuivre des recherches en vue d'une entente sur une méthode « biologique permettant le dosage des alcaloïdes spécifiques contenues « dans les préparations d'ergot ». L'ergotamine et l'ergotoxine sont précisément les alcaloïdes les plus actifs, les autres, ergotinine et ergotamine, l'étant un peu moins.

La teneur en alcaloïdes spécifiques a donc été ici retenue comme critérium aux fins de dosage. Et la méthode qui a paru la meilleure pour déterminer cette teneur est celle de la pharmacologie des Etats-Unis qui a adopté pour étalon le phosphate d'ergotoxine.

Elargissant notre horizon, résumons assez succinctement ce qui a été fait concernant certaines substances, soit par les Commissions internationales, émanation de la Commission d'hygiène de la Société des Nations, soit par quelques pharmacologistes dans cette voie biologique que nous préconisons pour le dosage des vitamines.

DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE DOSAGES

ET D'ESSAIS BIOLOGIQUES

Au risque de paraître non répéter nous rappelons ce que nous avons dit plus haut des méthodes biologiques en le complétant par les termes mêmes de Mme J. LEVY. Employées en matière médicamenteuse :

a) Ou elles utilisent une action élective et facilement contrôlable sur une *fonction* ou un *appareil* d'un animal choisi comme particulièrement sensible à cet effet ;

b) Ou elles étudient une action *spécifique* sur un organe isolé ;

c) Ou elles sont basées sur une simple détermination de la *toxicité* pour un animal donné.

Première technique basée sur l'étude de l'action spécifique d'une substance sur une fonction ou un appareil d'un animal.

a) Adrénaline.

C'est celle employée pour doser un produit adrénalinique. Elle est basée sur les recherches de CUSHNY qui ont montré que sur un même animal, les variations de la pression artérielle sont, dans une certaine mesure, proportionnelles aux doses d'adrénaline injectées par voie intraveineuse. On opère soit sur le chien, sur le chat découpé (Grande-Bretagne). Il n'y a pas d'étalon international. Pour ce produit les commissions d'Edimbourg et de Genève ont préconisé le dosage biologique, bien qu'il s'agisse d'une substance bien définie au point de vue chimique.

b) Antithermiques.

Cette technique est également d'usage pour titrer les antithermiques, en mesurant la baisse de température chez des animaux préalablement rendus hyperthermiques par l'injection intraveineuse de levure de bière (méthode de NICOLLE).

Deuxième technique basée sur l'action d'une substance sur un organe isolé.

a) Ergot de seigle.

Cette méthode est celle employée pour doser la teneur en alcaloïdes actifs de l'ergot de seigle, d'après l'amplitude des contractions de fragments utérins de lapine. Il n'existe pas d'étalon international mais les conférences internationales ont préconisé la méthode de BROOM et CLARK qui est basée sur l'action des alcaloïdes de l'ergot sur le système nerveux sympathique qu'ils paralysent de telle sorte que l'action ultérieure de l'adrénaline sur l'utérus isolé de lapin est fortement diminuée.

b) Digitale.

Elle a été également employée par TREVAN, BOOK, BURN et GADDUM pour mesurer l'effet d'une teinture de digitale par l'amplitude des mouvements de l'oreillette du lapin.

Ici, il existe une poudre étalon internationale qui fut préparée par le Professeur MAGNUS. Il est établi qu'un gramme de poudre-étalon contient 11,1 unités chat, 5,05 unités chien, 2.200 à 2.350 unités grenouille. Cette poudre est conservée en ampoules scellées de verre brun par le National Institute for Medical Research London. Et chaque pays peut, d'après cet étalon, établir son étalon national.

La préparation d'une nouvelle poudre-étalon a été confiée au Professeur BIJLSMA.

c) Lobe postérieur d'hypophyse.

Des différentes préparations d'extraits du lobe postérieur d'hypophyse on a dosé biologiquement soit l'activité ocytocique, soit l'activité hypertensive, soit l'activité antidiurétique dans le diabète insipide.

La mesure de l'activité ocytocique, dont nous parlerons seulement, est tirée de l'action stimulante sur l'utérus de cobaye vierge. A ce titre, elle ressort de la même technique.

Une unité internationale d'hypophyse a été préparée par le Professeur VOETGLIN dans des conditions bien définies. Elle exprime l'activité ocytocique de 0mmgr. 5 de poudre-étalon. Et la conférence internationale de Francfort a recommandé aux différentes pharmacopées d'exprimer l'activité des préparations d'hypophyse par rapport à cet unité.

C'est ainsi que le soluté officinal de la pharmacopée des Etats-Unis contient 10 unités internationales par centimètre cube.

On sait, par ailleurs, qu'en France, qu'il s'agisse de rétropituitrine de CARRION, de post-hypophyse de CHOAY, de pituitrine de PARK et DAVIS, l'activité des extraits du lobe postérieur est exprimée en fractions de lobe. Ces produits sont titrés de telle sorte que 1 cc. de solution, soit 5 cgr. d'extrait correspond à un demi-lobe. On fait même des solutions injectables dont 0 gr. 05 correspond à 1/8 de lobe.

Troisième technique basée sur la détermination de la toxicité d'une substance.

a) Digitale, Scille, Strophantus.

Elle a inspiré celle mise en œuvre par la pharmacopée des Etats-Unis pour la standardisation de la digitale, de la scille et du strophantus.

Elle consiste à déterminer la dose minima mortelle par gramme d'animal qui amène l'arrêt systolique du ventricule de grenouille en un temps inférieure en 1 heure ou en 12 heures (HOUGHTON).

b) Extrait thyroïdien.

Elle a également été utilisée pour le contrôle de l'activité des préparations de thyroïde qui s'appuie sur la curieuse propriété de l'extrait thyroïdien d'augmenter le métabolisme et d'atténuer, d'autant, l'effet

toxique de l'acide cyanhydrique, produit de dégradation de l'acétonitrile dans l'organisme. La dose minima mortelle pour une souris de 20 gr. est de 0 mmgr. 9 par gramme. Qu'on injecte la poudre-étalon internationale, donnée à la base de 10 mmgr. par 20 gr. de souris, elle doit préserver l'animal de tout accident.

Ajoutons que le Professeur REID HUNT a été chargé par les Commissions internationales de préparer et de conserver cet étalon constitué par une poudre desséchée de thyroïde contenant 2 0/0 d'iode.

Toutefois, avec une apparence de raison, on peut faire remarquer que ces dosages, d'allure un peu théorique, à coup sûr d'une technique délicate, n'ont pas encore fait leur entrée dans la pratique journalière de la pharmacologie. Elles ont seulement fait l'objet de vœux pressants, ajoutera-t-on, formulés par des savants qualifiés et appartenant à des Instituts spécialisés dans cet ordre d'études. Citons : Medical Research, Council Londres, Institut d'Ehrlich de Francfort, Institut Pasteur de Paris, Institut épidémiologique d'Etat de Varsovie, Institut d'hygiène publique de Bâle, de Moscou, Institut Kitasato de Tokio, etc. La valeur de l'objection n'est qu'apparente : l'exemple de l'*Insuline* est là pour en témoigner.

TITRE B

LE DOSAGE BIOLOGIQUE EST COURANT EN CE QUI CONCERNE L'INSULINE, LES ARSÉNOBENZÉNES, LES SÉRUMS.

a) *Insuline.*

On sait l'emploi journalier et l'efficacité de ce produit dont le titrage est effectué en tenant compte de la propriété physiologique essentielle de l'*Insuline*, à savoir, la réalisation d'une *hypoglycémie*.

Ce dosage biologique a été nécessité par la variabilité d'action de la substance et en particulier par la constatation de troubles graves, consécutifs à l'administration de doses élevées.

On sait que l'unité *clinique* est le tiers de l'unité *physiologique*.

Du procès-verbal de la Conférence technique réunie à Edimbourg en 1923 nous extrayons : « La Conférence recommande pour l'instant de « définir l'unité d'*insuline* comme étant le 1/3 de la quantité qui abaisse « la proportion de sucre contenu dans le sang à 0,0045 0/00, c'est-à-dire « au point où se produisent des convulsions chez un *lapin normal*, du poids « de 2 kgs et qui a été soumis à un jeûne complet de 24 heures avant l'in-
« jection ».

D'autre part, CHABANIER et ROUSSEL titrent leur « *Insulyl* » en prenant comme dose unité :

« La quantité d'extrait alcoolique de pancréas qui abaisse de 60 0/0 « la glycémie du même lapin de 2 kgs à jeûn depuis 16 heures ». Un centimètre cube de leur produit renferme une unité.

Sans doute, de sérieuses critiques ont été formulées : le test expérimental de l'injection au lapin n'est pas d'une sincérité absolue, a-t-on dit. Les convulsions peuvent survenir alors que la glycémie est restée sensiblement normale ou ne pas apparaître malgré une chute notable de la glycémie.

Cependant, la méthode de dosage physiologique reste celle qui a été adoptée, à l'heure actuelle, par tous les médecins. L'opinion publique a ratifié la valeur du test biologique.

On sait, par ailleurs, qu'un étalon international d'insuline, préparé par le Dr DALE de Londres, est conservé au Medical Research Council.

b) Arsenobenzènes.

De même en ce qui concerne les arsénobenzènes, peu stables et qui ne peuvent être obtenus chimiquement purs. Leur contrôle biologique s'est également imposé. Bien plus, il est imposé légalement : Le décret du 30 mars 1928 inspiré, d'ailleurs, par diverses conférences internationales prescrit ce contrôle qui porte sur la *toxicité* des différentes substances du type arséno : arsénobenzol, novarséno-benzol, sulfarsénol.

L'expérimentation doit porter soit sur le lapin, soit sur la souris. Disons seulement un mot de l'expérience conduite sur le lapin : une solution à 1/100 d'arsénobenzol à 15 ou 20° est injectée très lentement et simultanément dans la veine marginale de 4 lapins, à raison de 0 gr. 12 d'arsénobenzol par kilogramme de lapin.

Il faut, pour qu'un produit soit acceptable, que les 4 lapins injectés soient vivants le 7^e jour après l'injection et qu'ils n'aient présenté ni émission d'un flux diarrhéique qui se prolongerait 1/2 heure à 1 heure après l'injection, ni crise tonico-clonique caractérisée par une chute brusque sur le côté.

De même, les échantillons déterminant un amaigrissement rapide ne doivent pas être mis en vente.

c) Sérums.

L'application de la méthode biologique est un fait datant de quelque 40 ans dans la titration du sérum antidiphtérique dont nous nous occuperons uniquement. Et c'est, un peu ultérieurement, en présence du développement de la sérothérapie, que la loi du 25 avril 1895 réglementa la préparation, la vente et la distribution des sérums qui ne peuvent être débités qu'après autorisation du gouvernement, rendue après avis du Comité consultatif d'hygiène publique en France et de l'Académie de Médecine.

On titre soit le pouvoir préventif antitoxique, c'est-à-dire la propriété que possède le sérum antidiphtérique de préserver un animal contre la dose mortelle de toxine (injection faite 24 heures plus tard).

Ce pouvoir est de 1/50.000 quand un centième de centimètre cube de sérum protège un cobaye de 500 gr. contre une dose de toxine qui tue le témoin en moins de 30 heures.

Le pouvoir préventif est donc représenté par le rapport entre le poids de l'animal et la plus petite quantité de sérum nécessaire à l'immunisation.

Le pouvoir préventif des sérums de l'Institut Pasteur est supérieur à 1/100.000. On peut également titrer le *pouvoir préventif antimicrobien*. Enfin EHRLICH a proposé de doser le pouvoir *antitoxique*, c'est-à-dire la propriété neutralisante du sérum vis-à-vis de la toxine diphtérique dans un mélange fait *in vitro* et injecté ensuite à l'animal. Ayant proposé d'utiliser une toxine étalon il montra dans la suite qu'il était préférable de se servir d'une unité antitoxique, avec une *antitoxine* étalon.

L'unité antitoxique du sérum antidiphtérique est la quantité d'antitoxine qui, mélangée à cent doses mortelles de toxines récemment préparées, les rend inoffensives.

La dose mortelle minima de toxine est celle qui, injectée sous la peau, fait périr en quatre jours un cobaye pesant 350 gr.

Le pouvoir antitoxique du sérum antidiphtérique doit être au minimum de *deux cents unités antitoxiques par centimètre cube*. Les sérums de l'Institut Pasteur sont en général de 350 unités antitoxiques au centimètre cube.

TITRE C

ON A FAIT ÉGALEMENT LE DOSAGE BIOLOGIQUE DE CERTAINES SUBSTANCES MÉDICAMENTEUSES NON ENCORE ENVISAGÉES PAR LE COMITÉ D'HYGIÈNE DE LA SOCIÉTÉ DES NATIONS ET PAR LES PHARMACOPÉES.

a) Substances myotiques et mydriatiques.

Dans cette catégorie de substances dont le dosage biologique n'est pas encore entré dans la pratique, après les antithermiques dont nous avons dit un mot, il convient de classer celles provoquant du myosis ou de la mydriase.

La méthode de MUNCH consiste en la détermination de la plus faible concentration d'une solution d'atropine donnée produisant le même degré de mydriase qu'une solution étalon de concentration connue. Elle utilise comme animal d'expérience le chat.

b) Substances vaso-constrictrices et vaso-dilatatrices.

Les méthodes mises en jeu permettent la comparaison de l'activité des deux substances vasomotrices sans toutefois prétendre être la base d'un dosage biologique rigoureux. Nous croyons superflu d'en développer ici la technique.

c) Les anesthésiques locaux.

L'emploi très fréquent de ces anesthésiques explique les essais tentés pour mettre au point une méthode permettant de déterminer l'activité de ces substances et de comparer entre elles leurs valeurs anesthésiques.

En particulier J. REGNIER, dans sa thèse, a décrit les techniques utilisées pour les essais biologiques de ces anesthésiques : elles se résument soit en la mesure de l'anesthésie produite sur les terminaisons nerveuses, soit sur les troncs nerveux (sciatique de grenouille, de lapin, nerf lingual du chien).

d) La narcotine.

La narcotine elle-même, dans certaines préparations à base de poudre d'opium, a fait l'objet de recherches récentes aux fins d'établir son dosage biologique par voie d'expérimentation sur l'animal.

Les précédents ne manquent donc pas, qui nous incitent à rechercher également, et, si possible, à adopter concernant les substances renfermant des vitamines, un contrôle biologique. Façon de faire qui s'impose, en quelque sorte, *a fortiori*, si l'on veut bien encore se rappeler que les Commissions Internationales, dont nous avons parlé, l'ont préconisée *même* pour des produits chimiquement assez bien ou partiellement *définis*, qu'il s'agisse du principe des extraits surrénaux, l'adrénaline, qu'il s'agisse de l'ergot de seigle, qu'il s'agisse des arséno-benzènes ou de drogues digitales.

Cela est d'autant plus nécessaire que les vitamines sont des substances qui, jusqu'alors, n'ont pu être identifiées chimiquement.

CHAPITRE III

TITRE A

LES VITAMINES

a) Principales sources.

Sans doute nous connaissons les principales sources de chacune d'elles : nous savons, pour ne parler que de choses acquises et bien connues que la matière grasse du beurre, la graisse de bœuf, l'huile de foie de morue, le jaune d'œuf contiennent le facteur liposoluble A, que l'huile de foie de morue encore, l'ergostérol irradié procurent le facteur antirachitique D ou A', que la levure de bière est une source importante du facteur hydrosoluble B ainsi que le germe de blé et leurs extraits aqueux ou hydroalcooliques (OSBORNE et WAKEMAN).

Il est prouvé, enfin, que le jus de fruits renferme la vitamine C, dite antiscorbutique, en même temps que la vitamine B (OSBORNE et MENDEL).

b) L'existence des vitamines se déduit des effets pathologiques dus à leur absence et de leur activité thérapeutique. Régimes expérimentaux.

Mais, jusqu'à maintenant du moins, l'existence de ces vitamines est seulement déduite des méfaits de leur carence, des maladies qu'elle engendre, scorbut, béribéri, hikan, xérophtalmie, pellagre, keratomalacie, rachitisme, polynévrite aviaire. Et des régimes expérimentaux, les plus divers, carencés en un facteur donné, ont été conçus pour mettre en relief le rapport carence-maladie.

1° Soit la carence du facteur liposoluble A, mise en évidence par le régime alimentaire suivant, dû à OSBORNE et MENDEL :

Caséine purifiée.....	18 gr.
Lactose.....	20 gr.
Dextrine.....	56 gr. 3
Mélange salin.....	3 gr. 1
Agar-Agar.....	2 gr.

Il ne permet la croissance normale du rat que pendant 3 à 4 mois. La mort survient ensuite, après une brusque chute de poids, accompagnée de xérophtalmie. L'addition de 5 0/0 d'huile de coton ne modifie pas la courbe de croissance. L'huile d'olive, à la même dose, retarde la mort d'environ 1 mois, tandis que le beurre à 5 0/0, l'extrait éthéré d'ovaires mûrs de morue à 3 0/0 ou l'extrait de foie de porc provoquent la reprise de croissance et la survie des animaux (MAC COLLUM et DAVIS) ainsi que l'huile de foie de morue.

2° Soit la carence du facteur lipo-soluble D, dit antirachitique, à propos duquel il y a lieu de s'arrêter un peu plus pour mieux saisir encore le processus suivi, consistant à induire de l'existence de phénomènes morbides la carence d'une substance indispensable au bon équilibre de l'enfant ; bien qu'il soit possible et vraisemblable que dans la nature intime des choses, ce rapport de cause à effet n'ait pas la rigueur quelque peu mathématique que nous lui attribuons actuellement, faute de mieux.

Les maladies de carence sont, en effet, quelque chose de moins simple qu'il ne paraît, c'est l'avis du Professeur MARFAN et, après lui, nous pensons, au sujet du rachitisme et de son étiologie, que lorsqu'un organisme est

soumis à un régime de carence, son métabolisme est profondément trouble (1) et ce trouble libère des substances nocives. Aux effets de la carence elle-même s'ajoute donc une *auto-intoxication* qui, entre autres effets, détermine le rachitisme.

Quoiqu'il en soit de ces phénomènes toxiques, de cette « trophotoxémie » les faits cliniques et thérapeutiques répondent.

Ils ont prouvé, par les résultats acquis, qu'on a eu raison d'établir ce rapport.

Nous n'avons pas ici à nous étendre sur la définition clinique du rachitisme, seuls les stigmates radiologiques qui ont été fort bien étudiés par WEILL, MARFAN, LESNÉ, de GENNES, MAHAR, COLANERI, doivent être mentionnés parce qu'ils guident l'expérimentateur dans tout le cours de son expérience sur l'animal. Ils se résument dans le retard de l'ossification, le défaut d'intensité des ombres osseuses, l'élargissement des extrémités diaphysaires, la déformation en cupules de ces extrémités, les dentelures diaphyso-épiphysaires donnant une image de dents de peigne ou de franges, l'incurvation diaphysaire et le retard d'apparition des points d'ossification, l'apparition de tissu spongieux.

Et ces renseignements radiologiques, joints aux renseignements cliniques, permettent, par des examens répétés en série, de noter objectivement et de suivre pas à pas les effets d'une médication ou d'une alimentation alternativement privée ou pourvue du facteur D, son retentissement sur l'ossification et la structure histologique de l'individu, que cette vitamine soit donnée par le moyen de l'huile de foie de morue, des rayons ultra-violets ou des substances irradiées.

Soit, à titre d'exemple, un jeune rat blanc, de 1 mois environ, pesant 25 à 30 gr. et mis au régime 85 de Pappenheimer ainsi composé :

Mélange salin.....	4 gr. pour 100
Farine de blé.....	80 gr.
Albumine d'œuf.....	10 gr.
Beurre	5 gr.

l'animal est sacrifié au bout de 21 jours.

Si la nourriture a été abondante il a augmenté de poids, mais il présente des lésions macroscopiques et histologiques du rachitisme.

Cette dystrophie rachitiforme, facilement constatable, survenue chez un jeune rat élevé jusque-là dans de bonnes conditions d'hygiène, est évidemment la résultante d'une des deux carences à lui imposées.

Et sur le point seulement de savoir laquelle, les avis ont pu différer sans que, toutefois, cette divergence d'interprétation dont nous sommes amenés incidemment à dire un mot, n'entame en rien la légitimité du procédé d'identification de la vitamine par ses effets de carence, le seul vraiment à portée de notre main jusqu'à présent.

(1) Que le métabolisme soit troublé, ceci résulte des expériences de LIANG et WACKÉ qui prouvent que dans la carence en facteur A, l'organisme ne peut plus élaborer de lipides à partir de glucides.

Dans la carence en facteur B le quotient respiratoire est bas 0.75, 0.78 et même 0.44 d'après RAMOINO, chiffre qui n'a pu être reproduit. Ceci pour le métabolisme énergétique.

Pour ce qui est du métabolisme azoté, les fonctions digestives sont profondément troublées. LUMIÈRE considère même la vitamine B comme un excitant des glandes à sécrétion externe, comme un élément de maintien du tonus de l'appareil digestif.

La glycémie subit des modifications importantes. En bref, dans l'avitaminose B, l'animal, conclut H. SIMONNET, est incapable d'utiliser complètement les glucides et le métabolisme de ces substances conduit à la formation de produits toxiques.

Dans l'avitaminose D ou rachitisme, la teneur du sang du rat en phosphore s'abaisse de 5 à 6 mmgr. pour 100, chiffre normal, à 4-2 mmgr. pour 100.

La calcémie, par contre, conserve assez généralement sa valeur normale chez le rat, encore qu'on ait pu établir (CRAMER et HOWLAND) une relation entre la valeur du produit de la concentration du calcium de sérum (en milligrammes pour 100 cc.) et la concentration en phosphore minéral (en milligrammes pour 100 cc.). Quand la valeur de ce rapport est inférieure à 30 le rachitisme existe; au-dessus de 40 il n'y a plus de rachitisme.

Dans l'expérience rapportée plus haut MM. PAPPENHEIMER, A. HESS et MAC CANN ont incriminé, en effet, la carence de phosphore. Les auteurs américains SHIPPLEY, PARK et MAC COLLUM de même. La lésion des os rachitiques, pensent-ils, trouve sa cause immédiate dans la diminution du phosphore inorganique du sang ; le calcium, ajoutent-ils, ne se fixe sur l'os qu'à l'aide de l'ion phosphore ; si celui-ci manque, l'os ne se calcifie pas et le rachitisme se produit.

Mais des travaux, plus modernes encore, il résulterait, par contre, que la carence solaire serait, avec plus de raison, mise en cause ici. Et voici à peu près comment s'exprime cette théorie du rachitisme dû exclusivement à cette carence. Il existe dans l'organisme un facteur D, nécessaire à la formation du tissu osseux des jeunes animaux. Le facteur D (bien dissocié d'ailleurs semble-t-il du facteur de croissance A chimiquement et biologiquement) a été identifié par certains à l'ergostérol irradié. L'ergostérol *naturel* est inactif, il n'a aucune propriété rachitique, mais s'il est soumis à l'action des rayons ultra-violets, il se transforme en principe antirachitique.

L'ergostérol a été constaté dans le sang de l'homme et dans la peau ; un enfant en pleine croissance, qui vit dans une habitation obscure, sans lumière solaire, sera privé d'ergostérol *irradié*, c'est-à-dire du principe antirachitique.

c) La nature chimique et physique des vitamines nous est inconnue.

Mais il faut bien le dire. Ni la connaissance de certaines modifications humorales qu'entraîne l'absence d'une vitamine et dont nous avons dit un mot, ni les notions que nous possédons sur la répartition des vitamines dans les aliments, elles-mêmes basées à peu près exclusivement sur les résultats de l'épreuve biologique chez l'animal, ne suffisent à percer le mystère qui entoure la nature chimique et physique de ces substances essentielles à la vie et, comme telles, dénommées *vitamines* par FUNCK.

Certes encore nous pouvons avancer, pour ne parler que du facteur D, que la vitamine de l'huile de foie de morue paraît provenir du plankton, constitué par les crustacés et mollusques, lesquels en trouveraient la source dans les algues dont ils se nourrissent, lesquelles algues auraient subi l'irradiation solaire. Mais cette filiation, si poussée soit-elle, n'avance que fort peu les choses, du point de vue spécial qui nous occupe.

Parlant des vitamines, on en est toujours réduit à ne pouvoir que mesurer les « effets de leur absence », suivant l'expression de M. SIMONNET.

Les expériences réalisées sont toutes de physiologie pathologique.

Et précisément il semble bien que la nature de cette mesure doive participer de celle des phénomènes, seuls visibles et appréciables dans l'espèce, qui ressortissent seulement du domaine de la biologie.

TITRE B

DES DIFFÉRENTES MÉTHODES PHYSIQUES OU CHIMIQUES PRO- POSÉES POUR DOSER LES VITAMINES A. B. C.

Tout récemment encore, au *Congrès international de Pédiatrie* de Stockholm (18-21 août 1930), G. GÖGTER (de Leyde) a rapporté l'opinion de MM. REERINCK et VAN WYK qui auraient constaté qu'on peut doser, par une méthode purement physique, la quantité de vitamine D contenue

dans une préparation d'ergostérine irradiée. Il suffirait d'étudier le spectre d'absorption pour les rayons ultra-violets du mélange.

Mais, au moment où nous écrivons, nous ne possédons aucun détail concernant ces expériences.

Quoiqu'il en soit, nous essaierons dans les lignes qui suivent de synthétiser ce qui a été fait, en ces dernières années, par les méthodes chimiques ou physiques, quant aux essais de dosage des vitamines.

A. — DOSAGE PAR LA RÉACTION COLORÉE

a) Vitamine A.

C'est le procédé qui a été principalement employé quant au facteur liposoluble A.

Sous l'action de l'acide sulfurique concentré, certaines matières grasses, en solution dans le sulfure de carbone, le benzène ou le chloroforme, donnent une coloration pourpre ou violette.

Cette réaction peut être employée pour déceler la présence du facteur liposoluble A et, dans une certaine mesure, pour le doser du fait de l'association presque constante de cette réaction avec la présence du facteur A (DRUMMOND and WATSON).

Elle semble due à la présence d'un cholestérol ou d'un lipochrome.

Toutefois MARDEN et ROBISON sont d'avis qu'elle n'est pas due à ces seules substances.

Plus récemment, ROSENHEIM et DRUMMOND ont mis en présence de trichlorure d'arsenic une solution d'huile dans l'éther de pétrole. Le mélange a donné une teinte bleue assez stable et un témoin peut être constitué par une solution convenablement préparée de violet de gentiane.

b) Vitamine B.

La réaction colorée a été également mise en avant pour caractériser le facteur B. C'est elle qui sert d'index dans la réaction de JENDRASSIK dont voici la technique : la solution aqueuse de vitamine est additionnée d'acide acétique jusqu'à ce qu'elle en contienne 20/0. On ajoute ensuite un mélange à parties égales de perchlorure de fer N/10 et de ferricyanure de potassium.

On laisse reposer 10 minutes et l'on ajoute 1 à 5 volumes d'eau distillée. On obtient avec les produits contenant le facteur B une coloration *bleue* ou un précipité *bleu*.

c) Vitamine C.

BEZSSONOFF a appliqué le réactif phospho-tungsto-molybdique des phénols de Folin à l'identification de la vitamine C.

Il dilue 1 cc. de la solution à examiner avec 1 cc. d'eau ; puis il ajoute 5 gouttes de réactif et obtient une coloration *bleue* si le liquide contient du facteur C.

Mais on a fait remarquer que cette réaction est donnée par des substances qui ont perdu leur pouvoir antiscorbutique ou qui n'en ont point. Elle ne serait pas donnée, par contre, par des substances qui en contiennent.

BEZSSONOFF a, il est vrai, depuis quelque temps, modifié les conditions de sa technique.

Mais FUNK assure que la réaction n'est pas rigoureusement spécifique.

B. — DOSAGE PAR LE PHOSPHORE

GREEN a proposé de doser la richesse d'une substance en facteur B d'après la teneur en phosphore, s'appuyant sur ce fait que le facteur B est souvent associé aux produits phosphorés. Toutefois, il est établi que le parallélisme n'est pas aussi évident que GREEN l'a vu dans le cas du maïs. Et la coïncidence est fortuite.

C. — DOSAGE PAR L'AZOTE

SEIDELL, de son côté, a préconisé le dosage de la teneur en vitamine B d'après l'azote, parce que cette vitamine contient toujours de l'azote. Mais ses expériences ont porté sur des substances purifiées et les chiffres qu'il a donné perdent leur valeur, en opérant sur des substances naturelles.

Et, c'est pourquoi B. LEVINE et Van DER HOEVEN ont pensé faire mieux en combinant ce dernier procédé de dosage sur des produits de fractionnement, avec l'épreuve biologique sur l'animal.

TITRE C

DU FACTEUR ANTIRACHITIQUE D, EN PARTICULIER

a) Sa répartition dans la nature.

Il nous a paru intéressant de faire une étude spéciale de ce facteur dont on connaît l'efficacité thérapeutique dans le traitement du rachitisme. Et, à notre sens, une courte nomenclature des substances le contenant, doit précéder logiquement l'exposé des procédés de dosage mis en œuvre pour cette vitamine, serrée d'un peu plus près que ses sœurs dans ses retranchements, si l'on peut user de cette image quelque peu simpliste, à coup sûr d'un relief plus évident.

BILLS, d'abord, a dressé le tableau d'un certain nombre de *matières grasses* (foie de différents poissons), dont l'huile de foie de morue, riches en ce facteur.

1° *L'huile de foie de morue*, en particulier, a un pouvoir antirachitique des plus marqués (1). Et si, d'après MOURIQUAND et LEULIER, ni les sels de chaux, ni les sels de phosphore, ni les extraits endocriniens (en dehors de l'extrait parathyroïdien) ne paraissent pas avoir une action fixatrice certaine, par contre, l'huile de foie de morue constitue, ainsi que le soleil, l'un des deux grands fixateurs du CA.

2° *La margarine* contient peu de facteur D (200 fois moins que l'huile de foie de morue).

3° *Le beurre*, riche en facteur A de croissance a un pouvoir antirachitique faible, à moins que, d'après CHICK et ROSCOE, la vache laitière laissée au pâturage, n'ait été à peu près constamment nourrie que d'herbes fraîches, luzerne ou trèfle.

4° *Le lait*, d'après LESNÉ et VAGLIANO est un aliment pauvre en facteur D. Ces auteurs ont, d'ailleurs, montré que l'administration d'huile

(1) Encore que, comme nous l'avons déjà avancé, l'activité des huiles soit très variable (LESNÉ, CLÉMENT et SIMON) et certaines d'entre elles toxiques.

de foie de morue à une vache laitière accroît très notablement la valeur antirachitique de son lait. Et dans cet ordre d'idées encore, il convient de rappeler que le premier d'entre eux, en collaboration avec Mlle G. DREYFUS-SEE, a montré, au Congrès de pédiatrie de Stockholm, que l'irradiation quotidienne et progressive des seins chez les nourrices, en dehors d'une augmentation sensible et durable de la quantité de lait fourni, engendre une modification biologique qualitative caractérisée par l'apparition du facteur *antirachitique en quantité notable* (1).

4° *Les oeufs* ne sont riches en facteur D qu'autant que l'alimentation en apporte aux poules. BETHKE, KENNARD et SASSAMAN trouvent 10 fois plus de facteur D dans les oeufs lorsque les poules vivent à proximité d'herbe verte et luxuriante ou qu'elles sont insolées.

5° *Les aliments végétaux* ne sont pas très riches en principe antirachitique. Parmi les meilleurs citons les feuilles vertes, trèfle, luzerne ou leurs extraits alcooliques et éthers. Parmi ceux dont l'action préventive et curative est négligeable mentionnons l'épinard.

6° *L'huile et le beurre de noix de coco* ne sont actifs qu'autant qu'ils ont été préparés au soleil.

7° *L'ergot de seigle* aurait une action antirachitique (MELLAMLY et SARÉE).

Il conviendrait enfin, pour donner une idée tant soit peu adéquate de la présence multipliée de cette vitamine, de rappeler que CRUZ, COKE et CROXATTO (de Santiago, du Chili) ont décelé la vitamine D dans la *bile* et d'autres milieux humoraux (XXI^e Congrès français de Médecine, Liège, 23-27 septembre 1930).

b) Le facteur D et les substances irradiées.

Nous venons de voir quelques-unes des sources naturelles du facteur D mais on sait qu'un grand nombre de substances qui en sont dénuées à l'état normal peuvent acquérir ce facteur sous l'influence d'une exposition convenable aux rayons ultra-violet. Il en est ainsi de la plupart des huiles végétales, huile de lin et de coton (HESS et WEINSTOCK), des farines (LÉVY, SOLAL, CHRISTON et DALSACE), la levure de bière (HUMESMITH et SMEDLEY-MAC LEAN, LESNÉ, ROBERT, CLÉMENT et SIMON), du blé germé, de la laitue, du lait sec, du lait frais de vache et de chèvre, des fourrages. Toutefois une place tout à fait à part doit être donnée aux *stérols* d'origine animale ou végétale, parmi eux au cholestérol brut et surtout à l'*ergostérol*. Ce dernier, dont seulement nous nous occuperons, fut obtenu par TANRET, dès 1889, à partir de l'ergot de seigle. Il fut également extrait par lui de l'ergot d'autres graminées (diss et avoine). On l'obtient également en prenant certains champignons comme matière première et surtout la levure de bière.

Il est singulièrement actif dans le rachitisme expérimental à la dose de 1/1000 de mmgr., le cholestérol irradié ne l'étant qu'à la dose de 1 mmgr. Toutefois, si nous nous arrêtons plus volontiers à son étude c'est, avant tout, parce qu'on a tiré des modifications physiques et chimiques qu'il présente à l'irradiation des conclusions avancées concernant son activité biologique et son dosage.

(1) Le peu de pouvoir antirachitique du lait non irradié, s'entend aussi bien du lait de femme que du lait de vache. Ce dernier, rappelés-le contient lui aussi la vitamine C qu'il fournit largement. Malheureusement, d'après VAN LORSUM, l'homme, trop souvent, par la traite ou une pasteurisation, favorisant l'action nocive de l'oxygène, détruit en grande partie ce facteur.

Il n'en est plus de même du *lait irradié*. MOURIQUAND, A. LEULIER et Mlle SCHOEN (*Le Lait*, février-mars 1926) ont montré des cures de rachitisme par le lait irradié, lait de vache frais, soumis une demi-heure à 90 centimètres, à 1.500 bougies, sous une épaisseur de 5 centimètres.

TITRE D

L'ERGOSTÉROL IRRADIÉ

a) Généralités.

L'ergostérol type est le principal des 2 stérols de l'ergot mis en évidence par TANRET qui avait également isolé le fongistérol. Il constitue aussi l'un des 3 stérols de la levure de bière dont les deux autres, jusqu'alors connus, sont le zymostérol (SMEDLEY-MAC LEAN) et probablement le fongistérol.

D'après POHL qui a étudié les spectres d'absorption des divers stérols, l'ergostérol ne serait qu'une impureté du cholestérol mais produit d'une activité telle que, d'après ROSENHEIM et WEBSTER, on pourrait obtenir un ergostérol irradié actif aux doses quotidiennes de 1/10.000 et 1/100.000 de milligramme.

Mentionnons aussi qu'un certain nombre d'auteurs dont MOURIQUAND et LEULLIER (XII^e Congrès de Médecine, Liège) considèrent l'ergostérol comme une provitamine sous-cutanée qui se transformerait en vitamine sous l'effet des rayons ultra-violet de courte longueur d'ondes.

b) Ses propriétés chimiques et physiques.

Rappelons quelques caractéristiques de l'ergostérol. Cristallisé dans l'alcool à 95° bouillant ou l'éther hydraté chaud il répond à la formule $C_{27}H_{42}O \cdot H_2O$. Il se déshydrate à 105°. Il cristallise dans l'alcool en larges lamelles ou en fines aiguilles dans l'éther.

Il est soluble dans 36 parties d'alcool à 95° bouillant et dans 525 parties à froid.

La détermination de son point de fusion a donné lieu à d'assez grandes divergences, BILLS en a tracé le tableau et retient, quant à lui, les chiffres suivants (1928).

168° presque anhydre,

175° semi-anhydre,

183° hydraté.

Au point de vue chimique, l'ergostérol s'oxyde à la température ordinaire. Il jaunit et devient odorant. Les solutions chloroformiques brunissent assez rapidement à la lumière. En bref l'ergostérol est très sensible à l'oxydation : il est difficile de conserver des échantillons purs. Le mode de conservation aura une influence sur la durée pendant laquelle on peut utiliser cette substance irradiée.

c) Essais de dosage par la méthode physique et chimique de l'ergostérol irradié ou vitamine D.

1° Par l'étude du spectre. — Pour revenir à notre sujet, voyons quelques-unes des conclusions qu'on a cru pouvoir tirer des modifications spectrographiques de l'ergostérol irradié pour en apprécier l'activité et éventuellement doser sa valeur thérapeutique.

Mais, dès l'abord, il convient de remarquer que les conditions d'irradiation apportent un gros élément de variabilité dans les résultats obtenus.

Ils peuvent varier suivant le type de lampe employé, lampe Georges, lampe Cooper-Hewett, lampe Gallois, etc., l'âge de la lampe, la distance entre cette lampe et la substance à irradier, la nature du milieu interposé

(1) Actuellement on tire l'ergostérol de la levure de bière. La levure de bière contient environ 3 0/0 de matières grasses, celles-ci sont constituées d'environ 40 0/0 d'insaponifiable contenant 51 0/0 de stérols libres, 5 0/0 et 12 0/0 de stérols combinés (S. MAC LEAN, DAUBNEY et S. MAC LEAN).

(air, azote, eau), l'état en nature ou solution de la substance à irradier, la nature du solvant (éther, alcool), la température ambiante, la présence ou l'absence d'oxygène, etc.

Quoiqu'il en soit, il semble chose toute naturelle qu'on ait pensé à établir un parallélisme entre la perméabilité aux rayons ultra-violets d'un stérol, traduite par le degré de transparence spectrographique plus ou moins accentué, d'une part et sa richesse antirachitique, d'autre part.

On pouvait y penser avec d'autant plus de raison que l'on sait, après les expériences de WINDANS et HESS, ROSENHEIM et WEBSTER, le remarquable pouvoir d'absorption de l'ergostérol.

D'après M. SIMONNET, l'absorption serait encore visible avec une solution d'ergostérol à 1/100.000.

Assez vite, cependant, on s'est aperçu, pour reprendre les termes mêmes de M. G. TIXIER, dans son mémoire original paru dans le *Bulletin des Sciences pharmacologiques* de juin 1929, que « la transformation spectrographique ne s'arrête pas au stade d'action biologique maxima du produit, « la transparence continue d'augmenter alors que le degré d'activité antirachitique ne s'accroît plus et même diminue.

« Toutefois, ajoute cet auteur, assez rapidement (quelques minutes avec la source très intense que nous utilisons pour l'irradiation) l'ergostérol subit une transformation qui aboutit à la formation d'une résine : « l'absorption dans le spectre ultra-violet augmente alors de nouveau rapidement.

« Si l'on considère les deux courbes, courbe de transmission dans l'U. V. « et courbe d'activité antirachitique, en fonction du temps d'irradiation, « on constate un parallélisme au début, puis un décalage net entre les deux courbes.

Dès 1924, HESS et WEINSTOCK, STEENBOCK et BLACK, poursuivant l'étude des modalités de la transformation du cholestérol inactif en cholestérol actif avaient constaté qu'une irradiation trop prolongée ne favorise pas l'activation.

Et il n'est pas démontré que le maximum d'absorption du spectre à 2.470 U. A. relevé après une heure et demie d'irradiation par POHL, MORTON, HEILBRON et KAMM, coïncide avec l'apparition du pouvoir antirachitique le plus élevé. En ce qui concerne l'ergostérol, une demi-heure d'irradiation paraît donner le maximum d'effet thérapeutique.

2° *Par le digitonoside.* — Ces transformations spectrographiques s'accompagnent de modifications chimiques. Et l'on a pensé à faire de celles-ci un test de la valeur antirachitique de l'ergostérol. Parmi les plus intéressantes de ces modifications citons la diminution de la précipitabilité par le digitonoside. Le produit non précipitable par le digitonoside et soluble dans l'alcool contient la substance active.

Donc parallélisme entre l'activation et la non-précipitabilité.

Mais, comme le fait judicieusement remarquer M. SIMONNET : « Il est « évident qu'il s'agit là d'un mélange et qu'aucune conclusion ferme ne « peut être tirée de ses propriétés.

« Il est possible que la faible quantité de vitamine qu'il contient voit « toutes ses propriétés masquées par celles d'une ou plusieurs substances « indifférentes qui constituent la masse principale du mélange ».

3° *Par la réaction colorée.* — Comme pour les vitamines A, B, C, la réaction colorée a été mise en évidence, sinon pour doser, du moins pour déceler le facteur antirachitique. BEZSSONOFF, dès 1924, a appliqué à l'huile de foie de morue son réactif phosphotungstonybdique qu'il avait préconisé déjà pour la vitamine C.

La coloration obtenue lui paraît spécifique.

Toutefois SEXTON observe que l'ergostérol irradié ne donne pas la réaction de BEZSSONOFF.

SHEAR et KRAMER, de leur côté, ont donné comme caractéristique de la vitamine D, la *coloration rouge* qui est obtenue quand on fait bouillir une huile antirachitique avec du chlorhydrate d'aniline.

Mais pas davantage cette réaction n'est spécifique.

En conclusion de cette courte étude de l'ergostérol irradié il importe de souligner ce qui en ressort, à savoir qu'en ce qui concerne la médication par des substances dites irradiées où la proportion des éléments actifs est inconnue, ainsi que celle des éléments éventuellement toxiques, il a été jusqu'alors impossible de trouver un critère rationnel, décisif ou seulement probant de leur effet thérapeutique soit par la méthode chimique, soit par la méthode physique.

Autrement dit, l'étude de la vitamine D confirme ce que nous avons déjà constaté à propos des autres facteurs.

D'une manière générale et synthétique ce que nous pouvons savoir du *facteur A*, de sa sensibilité à l'air, de sa solubilité dans les liquides ou de sa résistance aux alcalis, du *facteur antirachitique* et de ses attributs physiques ou chimiques, sa solubilité dans les liquides par exemple, sa stabilité vis-à-vis des alcalis, sa résistance aux agents oxydants, du *facteur antinévritique* et de sa nature azotée, ce que nous pouvons savoir du *facteur antiscorbutique*, qu'il soit ternaire selon BEZSSONOFF ou azoté selon ZILVA, constitue un ensemble de notions qui sans doute permettent d'individualiser les différentes vitamines d'en faire la discrimination.

Mais, pour ce qui est de la possibilité de les isoler complètement, de les mesurer, de les peser, d'en évaluer les propriétés vitales autrement que par la méthode indirecte, qui est la méthode biologique, il semble bien qu'il faille attendre encore. Il est vraisemblable que, dans les extraits étudiés, des substances étrangères sont présentes qui contribuent à entretenir notre ignorance concernant la structure intime de ces vitamines, « substances imaginaires », a-t-on dit, « lumière intégrée » dit FOVEAU DE COURMELLES et, qu'en ce qui nous concerne, nous comparons quant à leur identification, à ces produits endocriniens dont les effets de carence ou de surproduction sont seuls sensibles à nos sens jusqu'à maintenant.

CHAPITRE IV

LA MÉTHODE DE DOSAGE BIOLOGIQUE

a) Son but.

Elle se propose ou de supprimer les troubles occasionnés chez un animal, le plus souvent le rat, également le pigeon, le cobaye, le chien, le chat par un régime expérimental carencé en une vitamine donnée ou de prévenir, chez ce même animal, l'apparition des troubles habituellement provoqués par cette carence.

b) De la nécessité d'une bonne technique.

Cette méthode ne va pas non plus sans difficultés. La technique en doit être précise. Quelques précautions sont d'usage ; il s'agira, par exemple, d'expérimenter de préférence, sur des animaux de même sexe. On sait, par exemple, que les femelles sont plus sensibles que les mâles à la carence du facteur de croissance A, que les jeunes sont plus sensibles que les adultes à la carence du facteur B.

A titre indicatif, voici quelques chiffres concernant le chien, donnés par les expérimentateurs allemands, le régime alimentaire étant le même :

Age initial	Survie	Expérimentateurs
4 mois	14 jours	Yoshine
12 mois	167 jours	Yoshine
12 mois	168 jours	Yoshine
18 mois	28 jours	Yoshine
18 mois	46 jours	Yoshine
18 mois	49 jours	Yoshine
2-3 ans	102 jours	Hirabayaski
2-3 ans	108 jours	Tsuji
10 ans	130 jours	Yoshine

d'après M. SIMONNET (Les Données et les Inconnues du problème alimentaire).

Il semble également indiqué de mettre, avant l'expérience, les animaux au même régime, afin d'égaliser, dans la mesure du possible, la mise en réserve des vitamines.

Les conditions de *luminosité* devront être les mêmes, car, indépendamment de l'influence toute spéciale de la lumière sur le développement de la vitamine antirachitique, il reste établi qu'elle modifie les conditions générales de la nutrition.

Egalement *l'entretien* des animaux a son importance, les résultats seront sujets à variation, suivant que les animaux auront ou n'auront pas accès à leurs excréments.

Lorsqu'il s'agit de guérir des troubles déterminés par une carence, il faut aussi tenir compte de ce fait que, souvent, l'appétit de l'animal a diminué à la suite de cette carence. Il en peut résulter une *sous-alimentation* et d'autres carences. Ce qui fait qu'il est parfois assez difficile de discriminer, lorsqu'une certaine quantité d'ingesta susceptible de contenir plusieurs vitamines est présentée à l'animal pour guérir sa carence et la maladie conséquente, la part qui revient à chacune d'elles.

Rappelons que des *animaux différents* réagissent différemment à des régimes artificiels carencés. La réponse du rat est différente de celle du pigeon.

Il y a plus. La même espèce d'animal dans des conditions identiques d'expérience, peut avoir une conduite différente, suivant les individus. D'après VOETGLIN et LAKE, un chat peut être maintenu en bonne santé pendant au moins 160 jours avec un régime exclusif de viande maigre, chauffée 3 heures à 120°, bien que pendant la gestation et l'allaitement ce même régime cause des paralysies. Par contre, MOURIQUAND et MICHEL avec la viande stérilisée et chez la même espèce obtiennent constamment la polyneurite.

c) De l'étalon international.

Ce qui tend à prouver, une fois admis le bien fondé du seul contrôle biologique, que l'institution d'un étalon international, établi d'après une expérience-type, sur un animal-étalon est nécessaire. Et c'est d'après cet étalon international, énoncé en unités biologiques que serait obligatoirement évaluée la valeur ou antixérophtalmique ou antiscorbutique ou antirachitique de tous les produits à vitamines ou vendus comme tels.

Il ne resterait plus au praticien, pour le maniement du traitement, qu'à tenir compte du facteur individuel et prescrire la dose adéquate. Car, ainsi que l'ont fait encore remarquer MM. LELONG et CHABRUN, à propos de la vitamine C, dans une récente séance de la Société de Pédiatrie (21 octobre 1930), il ne suffit pas d'une dose minimum, il faut donner une dose suffisante.

TITRE A

CONTROLE ET ÉTALONNAGE BIOLOGIQUE

DE LA VITASTÉRINE A

Il existe de nombreux types de régimes carencés en facteur A. En voici un :

Dextrose	46.3
Mélange salin.....	3.7
Gélatine	10
Avoine aplatie.....	40

en voici un autre, en partie dû à FUGIMAKI, modifié par R. CLÉMENT :

Caséine	18 %
Sucre en poudre fine.....	65 %
Huile d'olive.....	10 %
Levure de bière sèche.....	2 %
Mélange salin.....	5 %
Jus de citron et eau.....	<i>ad libitum</i>

Il en existe d'autres imaginés par OSBORNE et MENDEL, SIMONNET, JAVILLIER, WILSON, etc.

Il n'y a pas lieu d'exposer le détail de chacun d'eux, mais seulement de rappeler que dans la plupart, l'animal témoin d'élection est le rat. Les jeunes animaux sont issus de la même souche et reçoivent vers l'âge de 30 à 40 jours une alimentation très pauvre en facteur A. Nous rappelant que la *xérophtalmie*, le *ralentissement* et l'*arrêt de croissance* constituent les principaux signes cliniques de cette avitaminose, c'est de la réunion de ces deux tests que sera fait le contrôle.

Envisagé isolément, le test xérophtalmique serait insuffisant, certains auteurs estimant que cette lésion ne se produit pas constamment dans la carence en facteur A.

La méthode qu'on peut appeler *curative* consiste, dès lors, à introduire dans le régime la substance à essayer, dès que l'animal manifeste une légère tuméfaction des paupières, signe avant-coureur de la lésion oculaire.

a) Méthode de Zilva et Miura.

C'est encore la méthode curative qu'emploient ZILVA et MUIRA lorsque, l'*arrêt de croissance obtenu*, ils essaient de déterminer la plus petite quantité de facteur A nécessaire et suffisante pour obtenir une croissance normale.

b) Méthode de Javillier, Baude et Lévy-Lajeunesse.

D'autre part, JAVILLIER, BAUDE et LÉVY-LAJEUNESSE ont institué une unité biologique de facteur A qu'ils définissent ainsi : la quantité de ce facteur qui, surajoutée quotidiennement à la dose limite (dose d'entretien pour 100 grs de rat dans des conditions de régime déterminées) provoque une reprise de croissance se maintenant au moins 30 jours, l'angle de croissance étant de 30° et le gain de poids de 30 0/0.

Une firme met actuellement en vente un produit physiologiquement titré en unités javillier.

c) Méthode de Luce.

LUCE adopte comme standard de croissance : le gain de poids moyen de 10 à 12 grammes par semaine.

SHERMAN et MUNSELLE, le gain de poids quotidien de 3 grammes chez l'animal standard.

d) Méthode de E. Lesné et Robert Clément.

Ces auteurs ont, de leur côté, depuis quelque temps déjà, mis au point une méthode de contrôle et d'étalonnage qui est préventive et qui s'appuie très nettement sur les deux tests susvisés.

Ils définissent ainsi l'unité physiologique de facteur A :

« La dose quotidienne suffisante et nécessaire pour protéger le jeune « rat contre la xérophthalmie et la cachexie et pour permettre chez lui le « développement que l'on observe chez les animaux mis à régime complet « non carencé.

« Avec une goutte par jour de la plupart des huiles de foie de morue « on obtient ce résultat. Avec une huile riche en facteur A, la dose suffisante est moindre : une goutte quotidienne d'huile de cette qualité non « seulement protège contre les accidents du régime de carence (xérophthalmie et cachexie) mais permet souvent au jeune animal de quadrupler « son poids en sept à huit semaines, tandis que sa taille prend un développement très au-dessus de la normale ».

Et ils concluent : *Nous pensons qu'on devrait exiger d'une huile pour la déclarer officinale qu'elle possède au moins 45 unités physiologiques de facteur A par centimètre cube, c'est-à-dire qu'elle protège le rat mis au régime de carence à la dose d'une goutte par jour.*

Les huiles riches peuvent contenir 70 à 100 unités physiologiques et plus au centimètre cube.

Une gradation est ainsi établie dans la valeur des huiles allant du simple entretien floridé à différents paliers de croissance. Cette méthode synthétise, en quelque sorte, mais sous une forme précisée et relativement pratique, avec le centimètre cube pris comme unité de volume, les différents procédés de dosage biologique dont nous avons parlé, qui pris isolément laissent une grande place à l'arbitraire. Nous ne parlons que de ceux exposés précédemment car c'est intentionnellement qu'en ce qui concerne la vitamine A, en particulier, nous omettons de parler du parallélisme qu'on a essayé d'établir soit entre la richesse en facteur liposuble A, tant des végétaux (huile de lin par exemple) que des produits d'origine animale (beurre par exemple) et leur teneur en lipochromes, soit entre la richesse en facteur A et l'intensité de la fonction chlorophyllienne.

TITRE B

CONTROLE ET ÉTALONNAGE BIOLOGIQUE DE LA VITAMINE B

a) Effets de la carence.

Rappelons d'un mot les effets de la carence du facteur B chez le pigeon, pris habituellement comme animal d'expérience. La consommation exclusive de riz poli entraîne chez lui : la perte d'appétit, une diarrhée à peu près constante, des variations de température, des troubles de la respiration et de la circulation, enfin et surtout des troubles nerveux se manifestant sous forme de paralysies, de troubles cérébelleux et troubles sensoriels.

La crise de polynévrite a été proposée comme critérium, elle constitue un phénomène facile à apprécier. Et, semble-t-il, il sera relativement aisé d'apprécier la valeur curative d'une substance en constatant la disparition de phénomènes éminemment accessibles à notre perception visuelle. Sans doute, mais on a pu répondre qu'un certain nombre d'animaux soumis à la carence B ne présentent pas de phénomènes de polynévrite.

De ce que la crise de polynévrite a cessé, qui est une *crise* et par conséquent un phénomène aigu, s'ensuit-il que tous les autres effets pathologiques, plus ou moins latents, plus ou moins discrets de la carence, ont également disparu ? Et, d'autre part, on a fait remarquer que certaines substances, la pilocarpine, l'histamine, de composition chimique définie, font disparaître cette crise en dépit de la carence du facteur B concomitante.

b) Méthodes de dosage biologique.

LESNÉ et CLÉMENT envisageant le problème du dosage biologique de la vitamine B sous l'angle préventif définissent l'unité physiologique. La dose suffisante pour empêcher le développement du béribéri chez un pigeon de 300 à 350 grammes soumis au régime exclusif de riz décortiqué.

A titre d'exemple, la levure de bière sèche contient moins de 10 unités physiologiques de vitamine B par gramme.

Il semble bien, ici, qu'une difficulté subsiste pour déterminer le premier signe clinique, en date, à partir duquel on estimera qu'il y a carence. Le *béribéri* (kakka des Japonais) n'est pas un dans sa morphologie ni dans son évolution. Il reste complexe dans ses formes, allant de l'atrophie musculaire généralisée à l'anesarque, sans oublier ses formes cardiaques ou dyspnéiques et l'origine ou étiologie *béribérique* d'un phénomène morbide donné pourra éventuellement n'être mise en évidence qu'avec difficulté.

Retenant la notion préventive de ces deux auteurs qui nous paraît excellente, il y a lieu, par ailleurs, d'accorder une mention particulière à la méthode de SEIDELL (également préventive) quant à la facilité du dosage. Voici, en bref, cette méthode : des pigeons sont nourris avec du riz glacé, puis ils reçoivent une quantité convenable d'une substance standard d'activité connue qui maintient leur équilibre pondéral pendant un temps déterminé. Cette substance est ensuite remplacée par le produit à étudier. Il est possible alors de déterminer la quantité de ce produit qui est nécessaire pour que l'entretien de l'animal soit aussi bon qu'avec la substance *standard*, quantité évaluée par rapport à celle-ci en unités biologiques.

En somme, SEIDELL s'attache exclusivement au critérium *du poids*, dont la baisse constitue un des phénomènes morbides de la maladie en question, non d'ailleurs le plus apparent.

TITRE C

CONTROLE ET ÉTALONNAGE BIOLOGIQUE DU FACTEUR D, DIT ANTIRACHITIQUE

a) Le rôle primordial de ce facteur.

Laissant volontairement de côté la vitamine antiscorbutique nous désirons fixer notre attention plus spécialement sur le facteur antirachitique dont le dosage biologique est une chose des plus urgentes parce que son rôle est primordial dans la physiologie et la pathologie de l'enfance, parce qu'aussi le nombre des médicaments qui se réclament de lui est considérable.

En particulier, l'emploi des U. V. de l'ergostérine et des aliments irradiés est journalier, leur valeur thérapeutique est incontestable dans le traitement du rachitisme, de la tétanie, de l'osteomalacie, dans la carie dentaire et, d'une façon générale, les maladies engendrées par la perte du calcium.

HESS (de New-York) a, de nouveau, insisté au dernier Congrès de Pédiatrie sur la réalité de leurs effets bienfaisants, Armand DELILLE de même. M. BARRAUD dans son livre *Les Enfants rachitiques*, après HULDSCHINSKY, estime même que le traitement actino-thérapique du rachitisme doit être obligatoire comme la vaccination contre la variole.

Mais si l'emploi de l'ergostérol irradié, pour ne citer que cette substance, entraîne à doses appropriées d'heureuses modifications dans le chimisme sanguin : augmentation du taux du phosphore et calcium, chez les rachitiques, dans certains cas, une « hyperminéralisation » nuisible, dont nous avons dit déjà un mot, a été, par contre, signalée par HESS, LEWIS, due à des doses excessives voire courantes et il est entendu que des doses pondérales identiques peuvent avoir des effets physiologiques très différents.

L'incertitude régnante qui peut être préjudiciable, là, encore, justifie l'institution à bref délai d'un étalonnage biologique, en quelque sorte officiel.

Précédemment nous avons, à titre documentaire, rappelé les tentatives de dosages qui furent faites, basées sur les modifications spectrographiques de certains produits. En réalité, c'est surtout à la méthode biologique que les auteurs se sont adressés et très tôt. N'ayant pas à refaire, ici, la description des effets pathologiques qu'entraîne l'avitaminose du facteur D, les signes radiologiques, cliniques ou histologiques du rachitisme étant présents à tous les esprits, l'exposé de ce qui a été réalisé dans la voie biologique seul reste à faire et la conclusion à en tirer. Le rat est l'animal d'épreuve.

Cette méthode, d'ailleurs, et ceci est une remarque d'ordre général reste toujours assez semblable à elle-même, ou elle tend à prévenir, ou elle tend à guérir.

S'adressant à l'animal *vivant*, c'est-à-dire à un *complexe*, elle n'a pas la prétention de résoudre l'énigme des vitamines, de leur radiation ou du principe d'énergie qu'elles réalisent, mais seulement de donner une indication *pratique* concernant leur entretien, leur développement ou leur déficience dans l'organisme.

b) Les contrôles proposés.

1° MAC COLLUM, SIMMONDS, BECKER et SHIPLEY donnent indistinctement l'un des régimes nos 4.025, 4.026, 4.033, 4.034, composé de germe de blé, de levure, d'un mélange salin, carbonate de calcium, gélatine, caséine purifiée, ovalbumine, gluten, agar-agar, dextrine et beurre, à des rats pesant 35 à 60 grammes, âgés de 35 à 40 jours, pendant 35 à 40 jours.

Et voici comment ils pratiquent la vérification physiologique :

Sous l'effet du régime, le calcium est absent dans le cartilage, les animaux chancellent sur leur train postérieur.

Il convient, dès lors, d'incorporer à leur régime pendant 5 jours, la substance à étudier. On les sacrifie et on observe le degré de calcification obtenu dans les cartilages : l'articulation femoro-tibio-rotulienne est prélevée et sectionnée en 2 moitiés. L'une des pièces est décalcifiée et préparée pour l'examen microscopique ; l'autre immergée dans une solution de *nitrate d'argent*. Les rats mis au régime rachitigène ne présentent aucune trace de calcification de la métaphyse ni au niveau de l'épiphyse. *Le tissu reste incolore et ne porte pas de traces de nitrate d'argent.*

Les animaux, en voie de guérison, au contraire, présentent au niveau de l'épiphyse une ligne noire faite d'un dépôt d'argent qui constitue une ligne de calcification.

Il est assez curieux, toutefois, que ces mêmes auteurs ont fait remarquer que le jeûne fait réapparaître la ligne de calcification.

L'épreuve n'est décisive que si les animaux ont continué à consommer leurs rations.

Discussion de la valeur de ce contrôle. — Cette vérification est assez séduisante et assez précise, en apparence. Pourtant cette précision même qui, en définitive, repose sur la constatation d'un phénomène chimique précédé d'un processus histologique fait qu'on peut se demander si elle correspond bien à la réalité des faits, et s'il existe bien un parallélisme évident entre l'épaisseur de cette ligne et la zone calcifiée prise comme témoin de la valeur antirachitique du régime expérimenté.

Cette ligne, d'autre part, est-elle susceptible d'une mensuration précise ?

2° Nous opterions plus volontiers pour la proposition faite par DUTCHER, CREIGTON et ROTROCK de prendre comme test de valeur antirachitique d'une substance, la *teneur en cendres* du tissu osseux des animaux recevant cette substance et de prendre pour unité de facteur antirachitique la plus petite quantité de substance permettant de maintenir le taux des cendres au niveau qu'il possède initialement chez le jeune animal.

Discussion de la valeur de ce contrôle. — Mais, dira-t-on, c'est ramener le problème du rachitisme à une seule de ses manifestations qui peut parfois manquer. Le rachitisme est quelque peu protéiforme : l'ostéoporose, l'arrêt de l'ostéogénèse sont l'un de ses aspects, rien de plus. Nous entendons bien, mais cet aspect est de constatation bien courante et journalière.

3° De leur côté, pour le facteur D, LESNÉ et Robert CLÉMENT sont les initiateurs d'une méthode de dosage et aussi d'étalonnage que nous avons, d'ailleurs, déjà fait connaître à propos des autres vitaminés. C'est une méthode préventive, nous le savons, qui s'inspirant avant tout du désir de mettre fin à la phase actuelle d'indécision, veut traduire, dès maintenant, en termes concrets, en vue de l'application de chaque jour, la valeur thérapeutique des produits dits antirachitiques. Elle marque un progrès réel sur beaucoup d'autres méthodes, par la netteté des chiffres qu'elle propose et la simplicité relative de ses procédés de vérification. Envisageant donc avant tout les données pratiques, ils estiment qu'avec une goutte par jour d'une huile de foie de morue de bonne qualité, on obtient ce résultat et, prenant les mêmes bases d'estimation que pour le facteur A, ils pensent que l'activité thérapeutique minima que l'on doit exiger d'une huile de foie de morue est de 45 unités physiologiques de facteur D par centimètre cube.

Ayant contrôlé certaines huiles, ils ont constaté que certaines contiennent 90 unités au centimètre cube, un grand nombre n'en possédant qu'une vingtaine et même moins.

De telles différences plaident en faveur d'une *réglementation* de la vente de ces substances, portant notamment sur l'obligation faite au fabricant ou vendeur d'indiquer leur *mesure* antirachitique.

Cette variabilité déjà considérable lorsqu'il s'agit d'huiles de foie de morue ou de poissons, dans les effets physiologiques, prend une ampleur inquiétante lorsqu'il s'agit de produits irradiés.

Ces auteurs estiment qu'il faut environ 30 mmgr. de cholestérol brut irradié par jour pour prévenir le rachitisme, chez le rat d'expérience, ce qui fait qu'un cholestérol frais et bien irradié présente 33 unités physiologiques au gramme.

Mais FABRE et SIMONNET ont obtenu des *ergostérols* fortement antirachitiques à la dose de 1/0.001 mgr.

Et HESS et WINDAUS assurent que de bons ergostérols irradiés agissent à la dose de 1/0.002 mgr., soit 500.000 unités physiologiques, d'après l'étalon proposé et recommandé par LESNÉ et R. CLÉMENT (1).

Egalement, ces derniers font judicieusement observer que les substances irradiées voient leur activité antirachitique se dégrader avec le temps. Il conviendrait que tout médicament antirachitique portât avec lui soit la date de fabrication, soit la date limite d'utilisation.

(1) Ces auteurs définissent l'unité physiologique de facteur antirachitique, la dose quotidienne nécessaire pour protéger contre le rachitisme le jeune animal mis au régime 85 de PAPPENHEIMER.

CONCLUSION

Aussi bien en clinique humaine qu'en clinique infantile, la valeur thérapeutique des substances renfermant des vitamines n'est plus à démontrer. Leur emploi est journalier.

Toutefois une difficulté d'ordre pratique s'est tôt révélée, inhérente à la nature quelque peu mystérieuse de ces vitamines.

Comment mesurer cette valeur si souvent inégale suivant la substance employée ?

D'après le poids ? Le volume ?

Tout comme pour les hormones endocriniennes, les ferments ou certains alcaloïdes, on s'est heurté à une impossibilité : la valeur tant préventive que curative des produits ou substances à vitamines n'est en rien proportionnelle à leur poids ou volume.

On a donc envisagé divers procédés physiques ou chimiques de dosage tant pour les vitamines que pour le facteur antirachitique : réaction colorée étude du spectre, dosage par le phosphore, l'azote, le digitonide.

Nous avons exposé le détail de ces quelques essais, faisant la critique de certains.

Or, il nous est nettement apparu que ces méthodes manquent de la précision indispensable. La mise au point, nécessaire à leur adoption dans le domaine pratique en reste à faire.

Par contre, la méthode biologique qui compte d'ailleurs à son actif quelques heureux précédents, est à même de rendre les plus grands services en ce qui concerne le dosage et l'étalonnage souhaités.

Expérimentant sur l'animal, par des voies diverses, elle s'applique à mettre en relief soit la valeur préventive, soit la valeur curative des substances renfermant des vitamines sur cet animal soumis à un régime carencé.

Chemin faisant, nous avons marqué une préférence pour la méthode préventive qui nous a paru réduire au minimum les chances d'erreur.

C'est elle qu'ont employé MM. LESNÉ et Robert CLÉMENT qui préconisent l'adoption d'une unité biologique qu'ils définissent ainsi : le poids ou volume d'une substance qu'il faut donner chaque jour à l'animal mis à un régime de carence pour prévenir chez lui tout accident de cette carence.

Il serait souhaitable, toutefois, dans un but d'unification et de simplicité que l'unité biologique, une fois définie et adoptée par les collectivités compétentes ait une portée internationale. Il appartient, en particulier, à la Commission d'Hygiène de la Société des Nations de lui conférer ce caractère d'universalité.

Ainsi le praticien serait en mesure de faire aisément la discrimination entre les aliments à tort considérés comme riches en vitamines et ceux qui ont une réelle valeur thérapeutique.

Surtout, si comme MM. LESNÉ et CLÉMENT le proposent encore, obligation est faite aux fabricants d'accompagner les produits d'une notice signalant leur richesse en *unités biologiques* (rat ou pigeon ou cobaye) ainsi que la date de fabrication. De même que les autres médicaments, les substances renfermant des vitamines doivent être soumises à un contrôle de leur valeur thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu*, Leçons du dimanche, 2^e série.
- BARRAUD, Les Enfants rachitiques, 1930.
- Casimir FUNCK, Introduction à l'étude des vitamines, Vigot, 1924.
- Casimir FUNCK, 1913, An attempt to estimate the vitamine fraction in milk (*Bioch. Journ.*, 7, 211-213).
- Freudenberg und Gyorgy, 1920, Beitrag zu den biologischen Wirkungen der akzessorischen Nahrotoffe (*Munch. Med. Woch.*, 37, 1061).
- DRUMMOND and WATSON, 1922, the testing of foodstuffs for vitamins (*Analyst.*, 47, 235-246).
- P. HARVIER, Médication de la Nutrition, in précis de thérapeutique par P. Carnot (Baillière et fils), tome I.
- H. KREITMAR und Th. MOLL, Hypervitaminose durch grosse Dosen vitamine D (*Munch. Med. Woch.*, 1928, XV, 637-639).
- Journal of Industrial and Engineer Chemistry*, janvier 1922 (p. 14-64).
- Clinique des maladies de la 1^{re} enfance*, 2^e série, Paris (leçons X à XVI).
- JAVILLIER (M.), BAUDE (P.) et LÉVY-LAJEUNESSE, 1925. Sur le dosage physiologique du facteur A (*Bull. soc. chim. biol.*, 8, 831-841).
- JOURDAIN et SIMONNET, L'ergostérol irradié devant l'expérimentation clinique, 1929. Editions A, Chahine.
- Journal des Praticiens*, La prophylaxie du rachitisme, numéro du 8 novembre 1930.
- HESS (A. F.) and WEINSTOCK (M.), 1923, A study of light waves in their relation to rickets (*Journ. Ann. Med. Assoc.*, 80, 687-690).
- HESS (A. F.) and WEINSTOCK (M.), 1925, The antirachitic value of irradiated cholesterol and phytostérol, II. Further evidence of change in biological activity (*Journ. Biol. Chem.*, 64, 181-192).
- BILLS (C. E.), Antiricketic substances, VI. The distribution of vitamin D with some notes on its possible origin. (*Journ. Biol. Chim.*, 1927 (LXVII, 751-758).
- BILLS (C. E.) Antiricketic substances, V. The action of ultra-violet rays on the esters of cholesterol (*Journ. Biol. Chim.*, 1927 (LXXII, 13-19).
- BEZSSONOFF (N.), Sur les réactions colorées des facteurs lipo-solubles (*C. R. Acad. Sc.*, 1924, CLXXIX, 572).
- Armand DELILLE (P. F.), L'héliothérapie, 1914 (Masson, Paris).
- DUCHTER (R. A.), CREIGHTON (M.) and ROTHROCK (H. A.), Vitamin studies. XI. Inorganic blood phosphorus and bone ash in rats fed on normal rachitic and irradiated rachitic diets (*Journ. Biol. Chim.*, 1925, LXVI, 401-409).
- FABRE et SIMONNET, Contribution à l'étude des stérols irradiés (*C. R. Soc. Biol.*, 1918, IC, 193-195).
- HESS (A. F.) and ANDERSON (R.), The antirachitic value of irradiated cholesterol and phytostérol, VIII. The activation of sterol fractions by ultra-violet irradiation (*Journ. Biol. Chem.*, 1927, LXXIV, 651-657).

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

CHAPITRE I

Intérêt pratique du contrôle biologique des vitamines. Du contrôle biologique en général.

CHAPITRE II

Titre A

De quelques précédents dans l'application des méthodes de dosage biologique.

Ce qu'a préconisé la Commission d'Hygiène sur la Société des Nations
Différentes techniques de dosages et d'essais biologiques.

Première technique :

- a) Adrénaline,
- b) Antithermiques.

Deuxième technique :

- a) Ergot de seigle,
- b) Digitale,
- c) Lobe postérieur d'hypophyse.

Troisième technique :

- a) Digitale, Scille, Strophantus ;
- b) Extrait thyroïdien.

Titre B

Le dosage biologique est courant en ce qui concerne :

- a) L'insuline,
- b) Les arsénobenzènes,
- c) Les sérums.

Titre C

Du dosage biologique de certaines substances médicamenteuses non encore envisagées par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations et par les pharmacopées.

- a) Substances myotiques et mydriatiques,
- b) Substances vaso-constrictiles et vaso-dilatatrices,
- c) Les anesthésiques locaux,
- d) La narcotine.

CHAPITRE III

Titre A

Les Vitamines :

- a) Principales sources,
- b) L'existence des vitamines se déduit des effets pathologiques dus à leur absence et de leur activité thérapeutique. Régimes expérimentaux.
 - 1° Facteur liposoluble A,
 - 2° Facteur antirachitique.
- c) La nature chimique et physique des vitamines nous est inconnue.

Titre B

Des différentes méthodes physiques ou chimiques proposées pour doser les vitamines A, B, C.

- a) Dosage par la réaction colorée : Vitamines A, B, C.
- b) Dosage par le phosphore.
- c) Dosage par l'azote.

Titre C

Du facteur antirachitique D, en particulier :

- a) Sa répartition dans la nature : huile de foie de morue, margarine, beurre, lait, aliments végétaux, etc.
- b) Le facteur D et les substances irradiées.

Titre D

L'ergostérol irradié.

- a) Généralités,
- b) Propriétés chimiques et physiques,
- c) Essais de dosage par la méthode physique et chimique de l'ergostérol irradié ou vitamine D :
 - 1° Par l'étude du spectre,
 - 2° Par le digitoninide,
 - 3° Réaction colorée.

CHAPITRE IV

La méthode du dosage biologique.

- a) Son but,
- b) De la nécessité d'une bonne technique,
- c) De l'étalon national.

Titre A

Contrôle et étalonnage biologique de la vitastérine A.

- a) Méthode de Zilva et Miura,
- b) Méthode de Javillier, Baude,
- c) Méthode de Luce,
- d) Lesné et R. Clément.

III Titre B.

Contrôle et étalonnage biologique de la vitamine B.

- a) Effets de la carence,
- b) Méthode de dosage biologique Lesné et Clément, Seidell.

IV Titre C

Contrôle et étalonnage biologique du facteur D.

- a) Rôle primordial de ce facteur.

- b) Les contrôles proposés :

- 1° Mac Collum, etc.
- 2° Teneur en cendres,
- 3° Lesné et Clément.

